Journal of Horticultural Science
https://jhs.um.ac.ir

Research Article
Vol. 38, No. 3, Fall 2024, p. 563-575

Optimization of Tissue Culture Medium and the Combination of Growth Regulators to Increase Plantlet Production Efficiency in Walnut Micropropagation

M. Ghorbani[1*], K. Parvizi[2], M. Yazdandoost Hamedani [3], D. Hassani[4]

1 and 2- Ms Degree of Biotechnology in Agriculture and Associate Professor, Horticulture Crops Research Department, Hamedan Agricultural and Natural Resources Research and Education Center, AREEO, Hamedan, Iran, respectively.
(*- Corresponding Author Email: ghorbanimarzieh25@yahoo.com)
3- Assistant Professor of Seed and Plant Certification and Registration Department, Hamedan Agricultural and Natural Resources Research and Education Center, AREEO, Hamedan, Iran
4- Retired Professor of Agricultural Engineering, Temperate Fruits Research Center, Horticultural Science Research Institute, Agricultural Research, Education and Extension Organizations, Karaj, Iran

Received: 16-01-2024 Revised: 18-04-2024 Accepted: 04-05-2024 Available Online: 06-05-2024	**How to cite this article:** Ghorbani, M., Parvizi, K., Yazdandoost Hamedani, M., & Hassani, D. (2024). Optimization of tissue culture medium and the combination of growth regulators to increase plantlet production efficiency in walnut micropropagation. *Journal of Horticultural Science*, *38*(3), 563-575. (In Persian with English abstract). https://doi.org/10.22067/jhs.2024.86286.1318

Introduction

In our country, walnut tree propagation is traditionally done through seed cultivation, often resulting in seed rot and death due to fungal, bacterial, and viral contamination (MC Granahan *et al.*, 1986; Driver & Kenyuki, 1984; Saadat & Henry, 2002). The traditional method, in addition to low multiplication rates, leads to high variation in resulting seedlings, potential loss of seedlings due to contamination, and reduced efficiency in subsequent stages (Unit, 2012; Kaur *et al*., 2006). Previous research has mainly utilized concentrations of one milligram per liter of benzyl adenine along with small amounts of indole butyric acid for Iranian walnut growth and enrichment (Rodrigues, 1982; Revilla *et al*., 1989; Penuela, 1988; Mejzadeh *et al.*, 2010, 1997; Amiri & Qaraati, 2012; Riosleal *et al*., 2012). This research aims to build upon and optimize previous work, evaluating the effectiveness of different concentrations of two growth regulators, benzyl aminopurine and adenine sulfate, on walnut plantlet regeneration and growth traits in tissue culture.

Materials and Methods

This study was conducted to optimize the tissue culture protocol for the "Chandler" cultivar walnut and determine the most suitable culture medium and hormonal composition for micropropagation. Lateral and terminal buds from the current season's branches were sterilized and cultured in DKW medium containing 2 mg/liter of benzyl adenine hormone and 100 mg/liter of indole butyric acid hormone, with polyvinyl pyrrolidine at one g/liter and activated charcoal at 2 g. Two-factorial experiments were used to process and multiply the plant after the establishment phase. The first factor was DKW culture medium containing five levels of adenine sulfate (0, 20, 40, 60, and 80 mg/liter), and the second factor was benzylaminopurine plant growth regulator with five hormonal levels containing 0, 0.5, 1, 1.5, and 2 mg/liter in combination with 0.01 mg/liter of indole butyric acid hormone. DKW base culture medium without any plant growth regulating substances was considered as control. After two months, growth traits including plantlet weight, stem length, number of leaves, number of buds, and number of leaflets per plantlet were measured in different culture media. The resulting data were statistically analyzed using SAS 9.1 software, and means were compared using Duncan's multiple range test with a five percent probability level.

https://doi.org/10.22067/jhs.2024.86286.1318

Results and Discussion

The analysis of variance showed that both plant growth regulators, benzyl aminopurine and adenine sulfate, had a very significant effect at 1% probability level on plantlet weight, stem length, number of leaves, number of buds, and number of leaflets. The interaction effect of benzyl aminopurine with adenine sulfate treatment on plantlet weight and stem length was significant at the 1% probability level. However, the interaction effect of benzyl aminopurine with adenine sulfate treatment on the number of leaves, number of buds, and number of leaflets was not significant. The results indicated that an increase in the levels of growth regulators benzyl aminopurine and adenine sulfate led to an increase in plantlet weight. The positive effects of increasing the levels of growth regulating substances in increasing plantlet weight are likely due to their direct effect on nutrient absorption, utilization, and the photosynthesis process. These results align with the research of Hatemzadeh *et al*. (2017) and Saadat and Henrati (2002). The positive effects of higher concentrations of both growth regulators on the increase in the number of sprouts and the lack of significant difference between the two high concentrations confirm that the use of high levels does not exceed the economic threshold. It can be justified that in excessive and unconventional concentrations, positive effectiveness is not achieved, but it can also impose more costs on the walnut tissue culture program. The appropriate concentration of BAP and adenine sulfate increases the leaf surface through the effect on cell divisions, resulting in receiving more light radiation and increasing the rate of photosynthesis. It seems that the two growth regulating substances in the appropriate concentration intensified each other's effect, affecting the rate of absorption and utilization of materials from photosynthesis, leading to an increase in the fresh and dry weight of the seedling. This, in turn, leads to a decrease in the length of the reproduction period in the resulting seedlings and an increase in the efficiency of the seedling production in walnut tissue culture.

Conclusion

The use of both studied growth regulators significantly increased plantlet weight, stem length, number of leaves, number of buds, and number of leaflets compared to the control treatment. Plantlet growth was achieved with the use of plant growth regulators, whereas no growth was observed in their absence. All assessed traits increased significantly with the addition of plant growth regulators, with the highest trait values obtained through the simultaneous use of benzylaminopurine and adenine sulfate.

Keywords: Growth traits, Plant growth regulators, Proliferation, Tissue culture

نشریه علوم باغبانی
https://jhs.um.ac.ir

مقاله پژوهشی
جلد ۳۸، شماره ۳، پاییز ۱٤۰۳، ص. ٥٦٣-٥٧٥

بهینه‌سازی محیط‌کشت و ترکیب ماده تنظیم‌کننده رشد در افزایش راندمان تولید گیاهچه در ریزازدیادی گردو

مرضیه قربانی[۱*]- خسرو پرویزی[۲]- محمد یزدان دوست همدانی[۳]- داراب حسنی[٤]

تاریخ دریافت: ۱۴۰۲/۱۰/۲۶
تاریخ پذیرش: ۱۴۰۳/۰۲/۱۵

چکیده

این تحقیق به‌منظور بهینه‌سازی دستورالعمل کشت بافت گردو و تعیین بهترین محیط‌کشت و ترکیب ماده تنظیم‌کننده رشـدی در ریزازدیـادی ایـن گیاه، در مرکز تحقیقات کشاورزی و منابع طبیعی استان همدان اجرا شد. جوانه‌های جانبی و انتهایی گـردو رقـم 'چنـدلر' از قسمت میانی شاخه‌های سال جاری، برداشت شده و پس از مراحل سترون‌سازی در شرایط استریل داخل محیط‌کشت پایه DKW حاوی ۲ میلی‌گرم بر لیتر ماده تنظـیم‌کننـده رشـد بنزیل‌آدنین و مقدار ۰/۰۱ میلی‌گرم بر لیتر ماده تنظیم‌کننده رشد ایندول‌بوتریک‌اسید، ۱ گرم بر لیتر پلی‌وینیل‌پیرولیدین و ۲ گرم ذغال فعال کشت شدند. پس از مرحله استقرار که با تورم و سرسبزی جوانه‌ها و عدم وجود هر نوع علائم نکروزه و رنگ‌پریدگی آن‌ها همراه بود، به‌منظـور پـرآوری، از آزمـایش فاکتوریل در قالب طرح کاملا تصادفی استفاده شد. بدین‌منظور از محیط‌کشت DKW حاوی ماده تنظیم‌کننده رشد گیاهی بنزیـل‌آمینـوپـورین در پـنج سطح با غلظت‌های صفر، ۰/۵، ۱، ۱/۵ و ۲ میلی‌گرم بر لیتر در ترکیب با ۰/۰۱ میلی‌گرم در لیتر بوتیریک‌اسید به‌عنوان فاکتور اول و پنج سـطح مختلـف آدنین‌سولفات (صفر، ۲۰ و ۴۰، ۶۰ و ۸۰ میلی‌گرم بر لیتر) به‌عنوان فاکتور دوم، مورد استفاده قرار گرفت. پس از دو مـاه شاخص‌های رشد شامل صـفات وزن گیاهچه، طول ساقه نورسته، تعداد برگ، تعداد جوانه و تعداد برگچه در هر گیاهچه، در محیط‌کشت‌های مختلف مورد اندازه‌گیـری قـرار گرفـت. بـر اساس نتایج حاصل از تجزیه واریانس، دو ماده تنظیم‌کننده رشد گیاهی بنزیل‌آمینوپورین و آدنین‌سولفات اثر بسیار معنی‌داری در سطح احتمال یک درصد بر صفات مورد بررسی نشان دادند. متناسب با افزایش غلظت در هر دو ماده تنظیم‌کننده رشد، میزان پرآوری و رشد گیاهچه‌ها افزایش پیدا کرد. به‌طوری که در محیط کشت‌های حاوی ۲ میلی‌گرم بر لیتر بنزیل‌آمینوپورین و ۸۰ میلی‌گرم بر لیتر آدنین‌سولفات در مقایسه با سایر غلظت‌ها، اثـرات مثبـت قابـل توجهی در کلیه صفات مورد بررسی ایجاد گردید.

واژه‌های کلیدی: پرآوری، صفات رشد، کشت بافت، مواد تنظیم کننده رشد گیاهی

مقدمه

کشور ایران از رویشگاه‌های مهمی است که در آن گردو (*Juglans regia* L.) بصورت گسترده کشت می‌شود به‌طوری‌که در اکثر کشورها گردو را به نام گردوی ایرانی و به اصطلاح انگلیسی Persian Walnut می‌شناسند و به احتمال زیاد بذر آن در زمان‌های گذشته از ایران به برخی کشورهای دیگر منتقل شده است. مجموعه وسیعی از ژنوتیپ‌های مرغوب و نامرغوب در اکثر نقاط ایران از جمله همدان، قزوین، طالقان، آذربایجان، مازندران، سمنان، نجف آباد، فارس، کردستان، کرمان و ... به‌صورت مخلوط کشت می‌شود (Mohammadinejad *et al*., 2013). با استناد به آمارنامه کشاورزی (2020) سطح زیر کشت گردو در کشور ۱۶۵۱۰۰ هکتار و در استان همدان ۱۷۶۶۴ هکتار می‌باشد که بالاترین سطح زیر کشت گردو در

۱ و ۲- به‌ترتیب کارشناس ارشد بیوتکنولوژی کشاورزی و دانشیار، بخش تحقیقات علوم زراعی- باغی، مرکز تحقیقات و آموزش کشاورزی و منابع طبیعی استان همدان، سازمان تحقیقات، آموزش و ترویج کشاورزی، همدان، ایران
(*- نویسنده مسئول Email: ghorbanimarzieh25@yahoo.com)
۳- استادیار پژوهشی واحد تحقیقات ثبت و گواهی بذر و نهال، مرکز تحقیقات و آموزش کشاورزی و منابع طبیعی استان همدان، سازمان تحقیقات، آموزش و ترویج کشاورزی، همدان، ایران
۴- استاد بازنشسته مهندسی کشاورزی، پژوهشکده میوه‌های معتدله و سردسیری، مؤسسه تحقیقات علوم باغبانی، سازمان تحقیقات، آموزش و ترویج کشاورزی، کرج، ایران

https://doi.org/10.22067/jhs.2024.86286.1318

کشور را دارا می‌باشد. میزان تولید محصول و عملکرد آن در کشور به ترتیب ۲۶۱۲۶۲ تن، ۱۷۲۰ کیلوگرم در هکتار و در استان همدان ۶۳۰۲۵ تن و ۳۰۵۴ کیلوگرم در هکتار بوده و استان همدان رتبه اول را در تولید این محصول دارا می‌باشد (Anonymous, 2020). تولید نهال سالم گردو یکی از موضوعات مهمی است که در خصوص آن مطالعات گسترده‌ای انجام شده است. تکثیر درخت گردو در کشور ما اغلب به طریق سنتی از طریق جنسی (کشت بذر) انجام می‌گردد. تعداد زیادی از بذورکشت شده به‌دلیل وجود آلودگی‌های قارچی، باکتریایی و ویروسی دچار پوسیدگی شده و از بین می‌روند (Driver (Saadat & Hennerty, 2002& Kuniyuki, 1984 ;).

در روش سنتی تکثیر گردو، معمولا در یک هکتار حدود ۱۰۰ هزار بذر کشت می‌گردد و در شرایط مطلوب می‌توان انتظار داشت که حداکثر حدود ۵۰ تا ۶۰ هزار نهال بدست آید. ضمن این‌که از یکنواختی برخوردار نیستند، با تأخیر قابل توجهی نیز در باردهی همراه می‌باشند. پیوند این پایه‌های بذری علاوه بر ضرورت تهیه پیوندک از ارقام سازگار و با ویژگی‌های برتر، به مراقبت‌های ویژه جهت جوش خوردن و ایجاد ترکیب پیوندی بادوام و پایدار نیز نیاز دارد. در مواردی هم ممکن است که با وجود آلودگی‌های بذرزاد سبب کاهش راندمان موفقیت در جوش خوردن پیوندک در مراحل پس از پیوند بشود (McGranahan & Leslie, 1988; McGranahan *et al*., 1986; Vahdati, 2005; Kaur *et al*., 2006). در مجموع ضریب پایین تکثیر و وجود آلودگی‌های پنهان از مهمترین مشکلات تکثیر بذری گردو می‌باشد (Somerz *et al*., 1982; Driver & Kuniyuki, 1984).

بوسلا و میکلر (Bosela & Michler, 2008) در آزمایشی برای تعیین مؤثرترین سیتوکینین در شاخه‌زایی گردوی سیاه دریافتند که بنزیل آدنین، تیدیازرون (TDZ) و زآتین (ZEA) هر سه بر بازایی شاخه مؤثرند اما طویل شدن شاخه‌ها را فقط در غلظت ۵/۵-۱۲ میکرومولار بنزیل آدنین و غلظت ۵ -۲۵ میکرومولار زآتین مشاهده نمودند همچنین به برتری زآتین نسبت به بنزیل‌آدنین برای افزایش طول شاخساره اشاره نمودند اما اضافه نمودند که این تأثیر مثبت در غلظت‌های پایین اتفاق افتاده و در غلظت‌های بالاتر، باعث بروز عارضه شیشه‌ای شدن گردیده است.

وحدتی و همکاران (Vahdati *et al*., 2004)، در بررسی ریشه‌دار کردن و سازگاری جوانه‌های رشد یافته آزمایشگاهی در ارقام گردوی ایرانی، از سه رقم گردو Ghendler، Sunland و Vina و محیط کشت DKW حاوی 0.05 IBAµ M+ 4.4 BA Mµ و ۳۰ گرم ساکارز و ۲ گرم بر لیتر فیتاژل استفاده نمودند. پس از ۷ روز، جوانه‌ها با طول ۳-۴ سانتی‌متر برش داده شده و به‌مدت یک هفته به محیط کشت MS حاوی ۱۵ میکرومولار اسید ایندول‌بوتریک‌اسید و۳۰ گرم ساکارز و ۹ گرم بر لیتر آگار و تاریکی و دمای ۲۲ درجه سانتی‌گراد منتقل شدند. پس از آن به‌مدت ۲۸ روز به روشنایی منتقل گردیدند. در ادامه فرآیند ریشه‌زایی، پس از ۲۸ روز، از محیط‌کشت DKW و ورمیکولیت با نسبت ۱ به ۱/۲۵ و ۳۰ گرم ساکارز و ۲ گرم فیتاژل که در اتوکلاو استریل گردید استفاده نمودند و گیاهچه‌های ریشه‌دار را تولید کردند.

وحدتی و همکاران (Vahdati *et al*., 2008) در تحقیق دیگری که به‌منظور بهینه¬سازی محیط‌کشت گردو انجام دادند، اعلام نمودند که برخی از ارقام گردو به مقدار مواد معدنی بیشتری از آنچه در محیط کشت DKW به کار رفته است نیاز دارند و استفاده از مقادیر بیشتر میوانیوزیتول و مس می‌تواند در درصد رشد و ریشه‌زایی ریزنمونه‌های گردو مؤثر باشد.

پیغام‌زاده و کاظمی‌تبار (Paygamzadeh & Kazemitabar, 2011) اثر ماده تنظیم‌کننده رشدی بنزیل‌آمینوپورین، اسیدایندول استیک‌اسید و ژنوتیپ را بر روی جنین‌های رسیده گردو بررسی نمودند و محیط‌کشت DKW حاوی مقدار ۰/۱ میلی‌گرم بر لیتر BAP و یا محیط دارای ۱/۵ میلی‌گرم بر لیتر BAP همراه با مقدار ۰/۰۱ و ۰/۰۵ میلی‌گرم بر لیتر IBA را بهترین محیط‌کشت، برای تولید گیاهچه از جنین‌های رسیده معرفی نموده و به‌طور کلی اعلام نمودند هنگامی که از دو ماده تنظیم‌کننده رشد همزمان استفاده گردد، درصد جوانه‌زنی افزایش می‌یابد به‌نحوی‌که درصد جوانه‌زنی را در محیط اولی ۴۹/۳۲ ٪ و در دومی ۶۷/۷۶ ٪ گزارش نمودند.

در تحقیقی که توسط محمدی‌نژاد و همکاران (Mohammadinejad *et al*., 2013) بر روی ریزازدیادی گردو ژنوتیپ ۳۰۵ و Z60 انجام گرفت، اثر دو نوع محیط‌کشت DKW و WPM (۳۰ گرم بر لیتر ساکارز + ۸ گرم آگار + یک گرم بر لیتر پلی وینیل‌پیرولیدین PVP) و اثر سه غلظت ماده تنظیم‌کننده رشد بنزیل آدنین را با مقادیر صفر، ۰/۵ و یک میکرومولار را بررسی نمودند و محیط DKW را به‌عنوان محیط‌کشت برتر معرفی نمودند

یاری و همکاران (Yari *et al*., 2008) اثر فصل و نوع ریزنمونه را بر کشت گردو در شرایط *In vitro* بر روی رقم Z63 و Z60 بررسی نمودند. آن‌ها در زمان‌های مختلفی اقدام به نمونه‌گیری و کشت کردند و در نهایت بهترین زمان نمونه‌گیری را اواخر اردیبهشت ماه و بدترین زمان را مرداد ماه و تک گره برگی را به‌عنوان بهترین ریزنمونه معرفی نمودند.

احتشام نیا و غلامی (Ehteshamnia & Gholami., 2014) در بررسی میزان قهوه‌ای شدن بافت‌ها در شیوه‌های مختلف کشت بافت گردو، اثر دو محیط‌کشت MS و DKW حاوی ذغال فعال و

آسکوربیک اسید را بر روی دو رقم ایرانی چندلر و جمال بررسی نمودند و محیط‌کشت DKW حاوی ۲ گرم بر لیتر ذغال فعال را به عنوان بهترین محیط‌کشت معرفی نمودند. در آزمایش دیگری آنها جوانه‌ها را قبل از کشت به‌مدت ۲ ساعت در محلول‌های مختلف (آب، PVP و آسکوربیک اسید) قرار دادند و اعلام نمودند ریزنمونه‌های قرار گرفته در محلول PVP از نظر طول جوانه، وزن‌تر جوانه و تعداد برگ بهتر از نمونه‌های قرار گرفته در محلول آسکوربیک اسید بوده و همچنین این نمونه‌ها بهتر از آب عمل می‌کنند. این موضوع نشان می دهد استفاده از آنتی‌اکسیدان‌هایی مانند PVP می‌تواند مانع قهوه‌ای شدن بافت‌ها در فرآیند کشت بافت گردد.

هاشمی دهکردی و همکاران (Hashemidehkordi *et al.*, 2020) استفاده همزمان از ۱ میلی‌گرم در لیتر BAP به همراه ۲۰ میلی‌گرم در لیتر آدنین‌سولفات را در پینه‌زایی و اندام‌زایی در گیاه شیپوری گلدانی مؤثر دانسته‌اند. اثرات مفید آدنین سولفات در باززایی مریستم از کشت بافت سیب‌زمینی هنگامی‌که در ترکیب با BAP استفاده می‌شود، به اثبات رسیده است (Bhuiyan, 2013). استفاده همزمان از ۱۰ میلی‌گرم بر لیتر زآتین و ۲۰ میلی‌گرم بر لیتر آدنین سولفات را در جهت القای اندام‌زایی در محیط‌کشت WPM در ریزازدیادی توس توسط نظری و همکاران (Nazari *et al.*, 2017) توصیه شده است. عرب و همکاران (Arab *et al.*, 2003) نیزاستفاده همزمان از محیط‌کشت MS حاوی ۸۰ میلی‌گرم بر لیتر آدنین‌سولفات و ۱۰ میلی‌گرم بر لیتر ماده تنظیم‌کننده رشد 2ip را در ریزازدیادی رویان خرمای مضافتی محیط مناسب معرفی نمودند.

یکی از بهترین راه‌کارها برای مبارزه با بیماری‌ها و احداث باغ‌های یکنواخت با خصوصیت ژنتیکی یکسان و تولید محصول یکنواخت و با ارزش و بازار پسندی بالا، جهت صادرات به بازارهای جهانی استفاده از تکنیک کشت بافت و ریزازدیادی آن‌ها می‌باشد. تا زمانی‌که تولید این‌گونه نهال‌ها به تعداد کافی و قیمت مناسب صورت نگیرد، امکان اصلاح باغات موجود و توسعه باغات فنی جدید در کشور وجود نخواهد داشت. از طرفی موفقیت در ریزازدیادی گردو و میزان پرآوری ریزنمونه‌ها و نیز درصد ریشه‌زایی گیاهچه‌های حاصل با نوع و ترکیب محیط‌کشت و غلظت‌های مختلف آن‌ها و درجه اکسایندگی ترکیبات محیط‌کشت در جذب و خنثی‌سازی تانن‌ها، آلکالوئیدها و دیگر موارد بازدارنده رشد ارتباط تنگاتنگ دارد. بنابراین این تحقیق با هدف تکمیل و بهینه‌سازی دستورالعمل قبلی و ارزیابی کارآیی غلظت‌های متفاوت از دو ماده تنظیم‌کننده رشد بنزیل‌آمینوپورین و آدنین‌سولفات بر میزان باززایی و نیز صفات رشد گیاهچه‌های تولیدی گردو در کشت بافت به اجرا درآمد.

مواد و روش‌ها

ابتدا جوانه‌های جانبی و انتهایی گردو رقم 'چندلر' از قسمت میانی شاخه‌های سال جاری در اواخر اردیبهشت‌ماه، برداشت شدند. پس از جدا کردن برگ‌ها، ساقه‌های سالم و عاری از آفت و بیماری در محیط آزمایشگاه به قطعات کوچک تقسیم شده و به‌مدت یک ساعت در زیر آب جاری شسته شدند. سپس با استفاده از اتانول ۷۰ درصد به‌مدت ۲ دقیقه ضدعفونی شدند. پس از آن نمونه‌ها با استفاده از آب مقطر استریل شسته شده و در زیر دستگاه لامینارفلو به‌مدت بیست دقیقه در محلول دو درصد هیپوکلریدسدیم حاوی چند قطره توین بیست و مواد آنتی‌بیوتیک قرار گرفتند. به‌منظور حذف مواد فنلی از ۵۰۰ میلی‌گرم بر لیتر پلی‌وینیل‌پیرولیدین به‌مدت ۱۵ دقیقه استفاده گردید. سپس نمونه‌ها سه مرحله و در هر مرحله به‌مدت ۵ دقیقه با آب مقطر استریل آبکشی شد. پس از مراحل سترون‌سازی در شرایط استریل، نمونه‌ها داخل ظروف شیشه مربایی که حاوی ۱۰۰ میلی‌لیتر محیط کشت پایه DKW، ۳۰ گرم بر لیتر ساکارز، ۲ میلی‌گرم بر لیتر بنزیل‌آمینوپورین، ۰/۰۱ میلی‌گرم بر لیتر ایندول بوتریک اسید، ۱ گرم بر لیتر پلی‌وینیل‌پیرولیدین (PVP)، ۲ گرم ذغال فعال و ۷ گرم بر لیتر آگار و pH برابر ۵/۷ بود، کشت گردیدند. نمونه‌های کشت شده به‌مدت یک هفته در اتاقک رشد با دمای ۲۵ درجه سانتی‌گراد و در تاریکی نگهداری شدند و پس از آن به فتوپریود ۱۶ ساعت روشنایی و ۸ ساعت تاریکی انتقال یافتند. به‌منظور کاهش میزان مواد فنلی، نمونه‌ها هر هفته یکبار در محیط‌کشت مشابه واکشت شدند.

پس از مرحله استقرار، به‌منظور پرآوری و ریزازدیادی گیاه از آزمایش فاکتوریل در قالب طرح کاملا تصادفی به‌صورت مجزا و در سه تکرار استفاده شد. بدین‌منظور مواد تنظیم‌کننده رشد بنزیل‌آمینو پورین در پنج سطح مختلف (صفر، ۰/۵، ۱، ۱/۵ و ۲ میلی‌گرم بر لیتر) در ترکیب با ۰/۰۱ میلی‌گرم در لیتر بوتیریک‌اسید به‌عنوان فاکتور اول و آدنین‌سولفات در پنج سطح مختلف (صفر، ۲۰، ۴۰، ۶۰ و ۸۰ میلی گرم بر لیتر) به‌عنوان فاکتور دوم مد نظر قرار گرفت. محیط‌کشت پایه DKW فاقد هر گونه مواد تنظیم‌کننده رشد گیاهی، به‌عنوان شاهد در نظر گرفته شد. پس از دو ماه شاخص‌های رشدی شامل صفات وزن گیاهچه، طول ساقه، تعداد برگ، تعداد جوانه و تعداد برگچه در هر گیاهچه، در محیط کشت‌های مختلف مورد اندازه‌گیری قرار گرفت.

داده‌های حاصل، با استفاده از نرم‌افزار SAS 9.1 تجزیه آماری شده و مقایسه میانگین‌ها با استفاده از آزمون چند دامنه‌ای دانکن در سطح احتمال پنج درصد انجام شد.

نتایج و بحث

بر اساس نتایج حاصل از تجزیه واریانس (جدول ۱)، مواد تنظیم کننده رشد گیاهی بنزیل آمینو پورین و آدنین سولفات اثر بسیار معنی داری در سطح احتمال یک درصد بر وزن گیاهچه، طول ساقه، تعداد برگ، تعداد جوانه و تعداد برگچه نشان دادند. همچنین اثر متقابل تیمار بنزیل‌آمینوپورین در آدنین‌سولفات نیز بر وزن گیاهچه و طول ساقه در سطح احتمال یک درصد معنی‌دار گردید اما اثر متقابل تیمار بنزیل‌آمینوپورین در آدنین‌سولفات بر تعداد برگ، تعداد جوانه و تعداد برگچه معنی‌داری نشد.

بیشترین وزن گیاهچه (۵۷/۶۷ میلی‌گرم) در تیمار با ماده تنظیم کننده رشدی حاوی دو میلی‌گرم بر لیتر بنزیل‌آمینوپورین و ۸۰ میلی گرم بر لیترآدنین سولفات مشاهده شد که به تنهایی در یک گروه جداگانه قرار گرفت. پس از آن، به تیمار حاوی ۱/۵ و ۱ میلی‌گرم بر لیتر بنزیل‌آمینوپورین در ۸۰ میلی‌گرم بر لیتر آدنین‌سولفات بیشترین وزن گیاهچه را تولید کردند که در گروه دوم و جداگانه از سایر تیمارها قرار گرفت. کمترین وزن گیاهچه (صفر میلی‌گرم) در تیمار فاقد بنزیل آمینوپورین و آدنین‌سولفات ایجاد گردید که به تنهایی در گروه آخر قرار گرفت (جدول ۲).

با نتایج حاصله و بر اساس شکل ۱ مشخص شد که با افزایش سطوح مواد تنظیم‌کننده رشده بنزیل‌آمینوپورین و آدنین‌سولفات، وزن گیاهچه افزایش یافته است (شکل ۲). اثرات مثبت افزایش سطوح مواد تنظیم‌کننده رشد در افزایش وزن گیاهچه به‌طور قطع ناشی از تأثیر مستقیم این مواد بر افزایش سرعت جذب و بکارگیری مواد غذایی و تأثیر مستقیم آن بر فرآیند فتوسنتز می‌باشد. این نتایج با پژوهش افلاکی و همکاران (Aflaki *et al.*, 2017) و نیز سعادت و هنرتی (Saadat & Henertty, 2002) با اثرات غلظت‌های مختلف بنزیل‌آدنین و ساکارز و تأثیر مثبت آن‌ها در غلظت‌های بالاتر بر افزایش وزن گیاهچه همسو می‌باشد.

بیشترین طول گیاهچه (۷۰ میلی‌متر) در تیمار ماده تنظیم‌کننده رشدی حاوی ۲ میلی‌گرم بر لیتر بنزیل‌آمینوپورین و ۸۰ میلی‌گرم بر لیتر آدنین‌سولفات و کمترین طول گیاهچه (صفر میلی‌متر) در تیمار فاقد بنزیل‌آمینوپورین و آدنین‌سولفات ایجاد شد (جدول ۲ و شکل ۳).

با بررسی اثرات متقابل ماده تنظیم‌کننده رشد بنزیل‌آمینوپیورین و آدنین‌سولفات (شکل ۳) مشخص شده است که در غلظت‌های پایین ماده تنظیم‌کننده رشد بنزیل‌آمینوپورین، خطوط نمودار بهم نزدیک‌تر هستند و با افزایش غلظت ماده تنظیم‌کننده رشدی، فاصله خطوط بیشتر شده و طول گیاه به‌صورت قابل توجهی افزایش می‌یابد. بوسلا و میکلر (Bosela & Michler, 2008) در آزمایشی برای تعیین مؤثرترین سیتوکینین در شاخه‌زایی گردوی سیاه (*Juglans nigra*) دریافتند که هر سه ماده بنزیل‌آدنین، تیدیازرون (TDZ) و زآتین (ZEA) بر بازایی شاخه مؤثرند اما طویل شدن شاخه‌ها را فقط در غلظت ۵/۵-۱۲ میکرومولار بنزیل‌آدنین و غلظت ۵ -۲۵ میکرومولار زآتین مشاهده نمودند. همچنین به برتری زآتین نسبت به بنزیل‌آدنین برای افزایش طول شاخساره اشاره نمودند اما بیان نمودند که این تأثیر مثبت در غلظت‌های پایین اتفاق افتاده و در غلظت‌های بالاتر، باعث بروز عارضه شیشه‌ای شدن گردیده است که با نتایج حاصل از این آزمایش مغایرت دارد. کیپنیک و کلاقاضی (Kepenek & Kolagasi, 2016) در ریزازدیادی گردو، بیشترین درصد باززایی، بلندترین طول ساقه و بیشترین درصد رشد را در محیط‌کشت NGE دارای ۲/۵ و ۵ میلی‌گرم بر لیتر تیدیازرون همراه با ۲/۵ میلی‌گرم بر لیتر ایندول‌بوتریک‌اسید به‌دست آوردند. مدینا و همکاران (Medina *et al.*, 2011) بهترین و بیشترین رشد جوانه انتهایی را در ریزازدیادی گردوی ونزوئلایی در محیط حاوی ۰/۳، ۱/۲ و ۳ میلی‌گرم بر لیتر TDZ و ۰/۲۳ و ۱/۵ میلی‌گرم بر لیتر BA به‌دست آوردند.

مقایسه میانگین تعداد برگ در گیاهچه و در سطوح مختلف ماده تنظیم‌کننده رشد بنزیل‌آمینوپورین نشان داد که بیشترین تعداد برگ (۳/۸۷ عدد) در مقدار دو میلی‌گرم بر لیتربنزیل‌آمینو پورین حاصل شد که تفاوت معنی‌داری با سطوح ۰/۵، ۱ و ۱/۵ میلی‌گرم بر لیتر بنزیل آمینوپورین نداشت اما با تیمار فاقد بنزیل‌آمینوپورین (۱/۲۹ عدد) اختلاف معنی‌دار نشان داد. همچنین با مقایسه میانگین تعداد برگ در گیاهچه در سطوح مختلف آدنین‌سولفات مشخص شد که از پنج سطح مورد بررسی، چهار سطح تفاوت معنی‌داری با هم نداشتند اما تفاوت آنها با سطح فاقد آدنین‌سولفات معنی‌دار شد. بیشترین تعداد برگ (۳/۴ عدد) مربوط به تیمار پنجم (۸۰ میلی‌گرم در لیتر آدنین‌سولفات) و کمترین تعداد برگ (۱/۹ عدد) مربوط به تیمار اول (صفر میلی‌گرم بر لیتر آدنین‌سولفات) بود (شکل ۴ a و b).

مقایسه میانگین تعداد جوانه در گیاهچه با سطوح مختلف ماده تنظیم‌کننده رشد بنزیل‌آمینوپورین نشان داد که سطوح مورد بررسی در چهار گروه مختلف قرار گرفتند. بیشترین تعداد جوانه (۴/۵۳ عدد) مربوط به سطح پنجم ماده تنظیم‌کننده رشدی (دو میلی‌گرم بر لیتر بنزیل‌آمینوپورین) بود که تفاوت معنی‌داری با تیمار چهارم نداشت اما تفاوت آنها با سایر سطوح بنزیل‌آمینوپورین معنی‌دار بود و کمترین تعداد جوانه (۱/۶۴ عدد) مربوط به تیمار فاقد بنزیل‌آمینوپورین بود (شکل ۵ a).

مقایسه میانگین تعداد جوانه در گیاهچه با سطوح مختلف آدنین سولفات نشان داد که از پنج سطح مورد بررسی، چهار سطح تفاوت معنی‌داری با هم نداشتند اما تفاوت آن‌ها با سطح فاقد آدنین‌سولفات معنی‌دار بود. بیشترین تعداد جوانه (۴/۳۳ عدد) مربوط به تیمار پنجم

(۸۰ میلی‌گرم در لیتر آدنین‌سولفات) و کمترین تعداد جوانه (۲/۵۷ عدد) مربوط به تیمار اول (صفر میلی‌گرم بر لیتر آدنین‌سولفات) بود (شکل ۵ b).

نقش سایتوکینین‌ها در گیاهان به‌عنوان محرک تقسیم سلولی، ممانعت از پیری برگ‌ها و جلوگیری از تخریب کلروپلاست و تحریک سنتز کلروفیل محرز شده است، که نتیجه آن می‌تواند با افزایش تعداد جوانه در گیاهچه، تعداد برگ و نهایتا وزن تر گیاهچه همراه باشد. در این پژوهش اثرات مثبت غلظت‌های بالاتر از هر دو تنظیم‌کننده رشد بر افزایش تعداد جوانه و عدم تفاوت معنی‌دار بین دو غلظت بالا، مؤید این موضوع می‌باشد که استفاده از سطوح بالا در زمانی‌که از آستانه اقتصادی تجاوزر نکند، قابل توجیه بوده و در غلظت‌های بیش از حد و غیر متعارف نه تنها اثربخشی مثبتی حاصل نمی‌شود بلکه می‌تواند هزینه بیشتری به برنامه کشت بافت گردو تحمیل نماید. یاری و همکاران (Yari *et al.*, 2014) بیشترین درصد تعداد جوانه، بیشترین تعداد جوانه حاوی کالوس و بلندترین طول جوانه و همچنین بیشترین وزن تر در هر گیاهچه را در مقدار ۰/۸ میلی‌گرم بر لیتر تیدیازرون و بنزیل‌آدنین به‌دست آوردند.

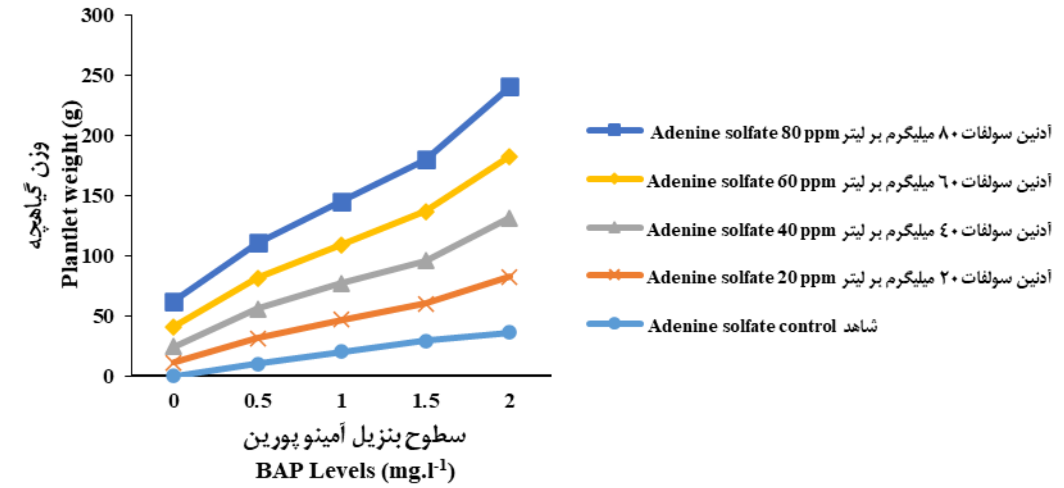
جدول ۱- تجزیه واریانس اثر مواد تنظیم کننده رشد گیاهی بر باززایی گیاهچه و صفات رشد گردو رقم ’چندلر‘

Table 1- ANOVA for the effect of plant growth regulators on plantlet regeneration and growth traits of walnut cultivar ‘Chandler’

منابع تغییرات Source of varitions	درجه آزادی d.f	میانگین مربعات Means squares				
		وزن گیاهچه Plantlet weight	طول ساقه Stem length	تعداد برگ Leaf number	تعداد جوانه Bub number	تعداد برگچه Leaflet number
بنزیل‌آمینوپورین BAP (B)	4	1893.73**	1395.54**	14.61**	19.44**	487.96**
آدنین‌سولفات Adenine Sulfate (AS)	4	654.01**	2111.77**	5.86**	7.99**	198.89**
B× AS	16	28.72**	53.55**	0.15ns	0.41ns	198.89ns
خطا Error	50	7.44	9.29	0.53	0.59	7.55
ضریب تغییرات C.V (%)		9.16	7.95	25.55	21.28	18.35

ns، * و **: به‌ترتیب عدم وجود تفاوت معنی‌دار و تفاوت معنی‌دار در سطح احتمال ۵ و ۱ درصد.

ns, * and **: Non-significant, and significant at 5% and 1% of probability levels, respectively



شکل ۱- اثر متقابل سطوح مختلف بنزیل‌آمینوپورین × آدنین‌سولفات بر وزن گیاهچه گردو رقم ’چندلر‘ ۸ هفته پس از کشت

Figure 1- The interaction effect of thediffrent levels of BAP ×adenine sulfate on the plantlet weight of walnut cultivar ‘Chandler’ 8 weeks after cultivation (DMRT, *p≤0.05*)



۱ میلی‌گرم بر لیتر BAP
1 mg/L BAP



۰/۵ میلی‌گرم بر لیتر BAP
0.5 mg/L BAP



۲ میلی‌گرم بر لیتر BAP
2 mg/L BAP



۱/۵ میلی‌گرم بر لیتر BAP
1.5 mg/L BAP

شکل ۲- رشد گیاهچه گردو رقم 'چندلر' در سطوح مختلف بنزیل‌آمینوپورین ۸ هفته پس از کشت

Figure 2- The growth of walnut plantlets cultivar 'Chandler' in different benzyl aminopurine levels in 8 weeks after cultivation

مقایسه میانگین تعداد برگچه در گیاهچه در سطوح مختلف ماده تنظیم‌کننده رشد بنزیل‌آمینوپورین نشان داد که پنج سطح مورد بررسی در گروه‌های کاملا متفاوت از همدیگر قرار گرفتند. بیشترین تعداد برگچه (۲۱/۴۷ عدد) مربوط به سطح پنجم (دو میلی‌گرم بر لیتر بنزیل‌آمینوپورین) و کمترین تعداد برگچه (۲/۵۷ عدد) مربوط به تیمار فاقد بنزیل‌آمینوپورین بود (شکل ۶ a). در مقایسه میانگین تعداد برگچه در گیاهچه با سطوح مختلف آدنین‌سولفات مشخص شد که پنج سطح مورد بررسی در سه گروه متفاوت قرار گرفتند. بیشترین تعداد برگچه (۱۹/۸۷ عدد) مربوط به سطح پنجم (۸۰ میلی‌گرم بر لیتر آدنین‌سولفات) و کمترین تعداد برگچه (۱۰/۲۱ عدد) مربوط به تیمار فاقد آدنین‌سولفات بود (شکل ۶ b).

با تحقیقات گسترده‌ای در زمینه تأثیر مواد رشد گیاهی بر فرآیند فتوسنتز انجام گرفته است، مشخص شده است که کاربرد تنظیم کننده‌های رشد گیاهی در غلظت‌ها و زمان‌های مختلف هم در تنظیم فتوسنتز و هم در حرکت فرآورده‌های فتوسنتزی از محل تولید آنها در برگ به مقصد نقش اساسی دارد (Tsonev *et al.*, 1998). غلظت مناسب BAP و آدنین‌سولفات از طریق اثر بر تقسیمات سلولی باعث افزایش سطح برگ شده که نتیجه آن دریافت بیشتر تشعشع نوری و افزایش سرعت فتوسنتز می‌باشد. در این بین به نظر می‌رسد که دو ماده تنظیم‌کننده رشد در غلظت مناسب اثر هم‌دیگر را تشدید کرده و با تأثیر بر سرعت جذب و بکارگیری مواد حاصل از فتوسنتز، منجر به افزایش وزن تر و خشک گیاهچه گردیده‌اند. در این وضعیت با قابلیت انتقال گیاهچه‌های تولیدی به محیط ریشه‌زایی به نوبه خود منجر به کاهش طول دوره تکثیری در گیاهچه‌های حاصل و افزایش راندمان تولید گیاهچه در کشت بافت گردو می‌شود. نتایج مشابهی از تأثیر BAP بر رشد و باززایی گیاهچه‌های حاصل از کشت بافت گردو در

پژوهش‌های پیغام‌زاده و کاظمی‌تبار (Payghamzadeh, Paygamzadeh, 2010; 2011 &Kazemitabar) نیز حاصل گردیده است.

هاشمی دهکردی و همکاران (Hashemidehkordi *et al.*, 2020) استفاده همزمان از ۱ میلی‌گرم در لیتر BAP به همراه ۲۰ میلی‌گرم در لیتر آدنین‌سولفات را در پینه‌زایی و اندام‌زایی در گیاه شیپوری گلدانی مؤثر دانسته‌اند. اثرات مفید آدنین‌سولفات در ترکیب با BAP بر پرآوری و رشد گیاهچه‌های سیب‌زمینی در گزارش بویان (Bhuiyan, 2013) نیز به اثبات رسیده است. همچنین استفاده همزمان از ۱۰ میلی‌گرم بر لیتر زآتین و ۲۰ میلی‌گرم بر لیتر آدنین سولفات را در جهت القای اندام‌زایی در محیط‌کشت WPM در ریزازدیادی توس توسط نظری و همکاران (Nazari *et al.*, 2017) و همچنین عرب و همکاران (Arab *et al.*, 2003) توصیه شده است.

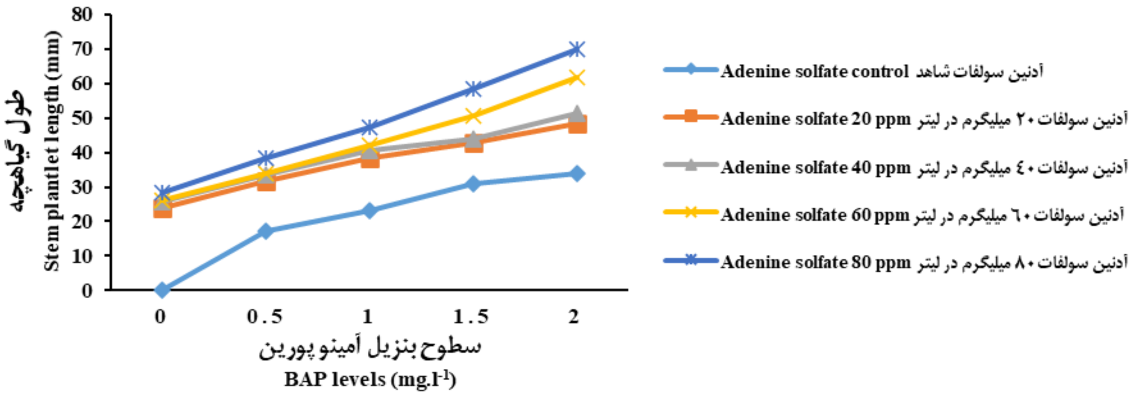
جدول ۲- اثر متقابل بنزیل آمینو پورین × آدنین سولفات بر صفات رشد گیاهچه گردو رقم 'چندلر'

Table 2- The interaction effect of the different levels of benzylaminopurine ×adenine sulfate on the growing traits of walnut plantlets cultivar 'Chandler'

تیمارها Treatments	آدنین سولفات Adenine Sulfat ($mg.l^{-1}$)	بنزیل آمینو پورین BAP ($mg.l^{-1}$)	وزن گیاهچه Plantlet weight (g)	طول ساقه Stem length (cm)	تعداد برگ Leaf number	تعداد جوانه Bub number	تعداد برگچه Leaflet number
1	0	0	0.00 p	0.00 n	0.00 i	0.00 ij	0.00 n
2	20	0	12.00 o	24.33 lm	1.00 hi	1.33 ij	12.00 mn
3	40	0	13.67 o	26.33 j-m	1.33 ghi	1.67 hi	13.67 mn
4	60	0	16.33 no	28.33 jkl	1.67 fgh	2.00 ghi	16.33 lm
5	80	0	27.00 h-k	30.33 lj	2.00 e-h	2.67 e-h	27.00 i-l
6	0	0.5	19.00 mn	22.00 m	1.67 fgh	2.33 f-i	19.00 jkl
7	20	0.5	25.00 jkl	33.67 hi	2.00 e-h	3.33 c-f	25.00 g-k
8	40	0.5	24.33 kl	38.33 fg	2.67 cdef	3.67 b-e	24.33 f-k
9	60	0.5	26.00 i-l	42.67 ef	3.33 bcd	4.33 abc	26.00 e-i
10	80	0.5	29.33 g-j	48.33 cd	3.33 bcd	4.33 abc	29.33 d-h
11	0	1	21.67 lm	24.67 klm	2.00 e-h	2.67 e-h	21.67 kl
12	20	1	26.67 h-k	34.00 ghi	3.00 b-e	3.67 b-e	26.67 f-k
13	40	1	30.00 f-i	40.67 ef	3.33 bcd	4.33 abc	30.00 f-j
14	60	1	32.33 efg	44.00 de	3.33 bcd	4.00 bcd	32.33 d-h
15	80	1	34.33 def	51.33 c	3.33 bcd	4.67 ab	34.33 bcd
16	0	1.5	25.67 i-l	25.67 klm	2.33 d-g	3.00 d-g	25.67 hijk
17	20	1.5	30.67 fgh	35.67 gh	3.33 bcd	4.00 bcd	30.67 c-g
18	40	1.5	36.00 de	41.00 ef	3.67 abc	4.67 ab	36.00 b-e
19	60	1.5	41.00 c	50.67 c	4.00 a	4.67 ab	41.00 c-f
20	80	1.5	40.67 c	61.67 b	3.67 abc	4.65 ab	40.67 bc
21	0	2	33.00 efg	29.00 jk	3.00 b-e	4.00 bcd	33.00 f-j
22	20	2	38.00 cd	38.33 fg	3.67 abc	4.33 abc	38.00 bcd
23	40	2	45.67 b	47.33 cd	4.00 a	3.67 b-e	45.67 bcd
24	60	2	49.00 b	58.33 b	4.00 ab	5.33 a	49.00 b
25	80	2	57.67 a	70.00 a	4.67 a	5.33 a	57.67 a

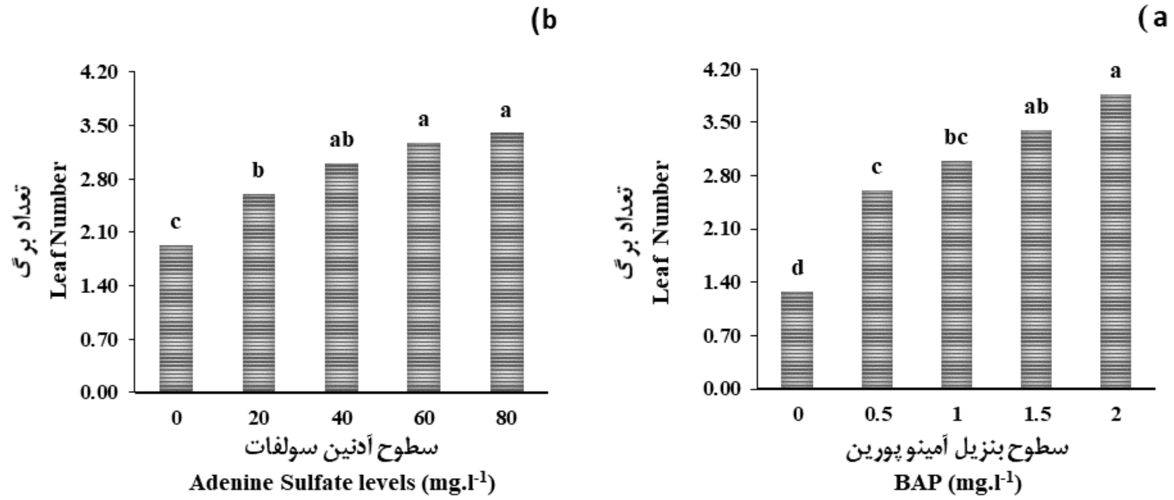
میانگین‌های با حروف مشترک بر اساس آزمون چند دامنه‌ای دانکن در سطح احتمال ۵ درصد اختلاف نشان ندادند.

Means with common letters did not show differences based on Duncan's multiple range test at the 5% of probability level.



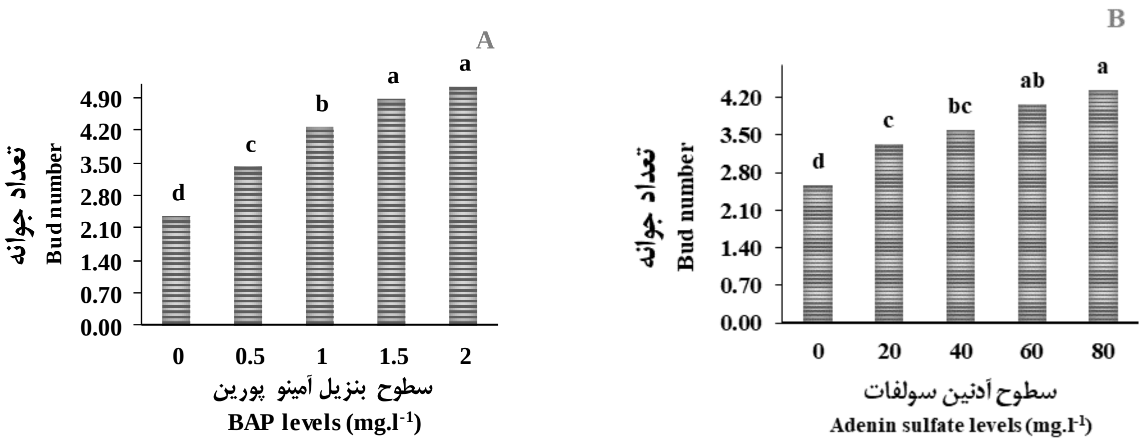
شکل ۳- اثر متقابل بنزیل‌آمینوپورین × آدنین‌سولفات بر طول گیاهچه گردو رقم 'چندلر' ۸ هفته پس از کشت

Figure 3- The interaction effect of the different levels of BAP ×adenine sulfate on the plantlet length of walnut cultivar 'Chandler' 8 weeks after cultivation (DMRT, $p \leq 0.05$)



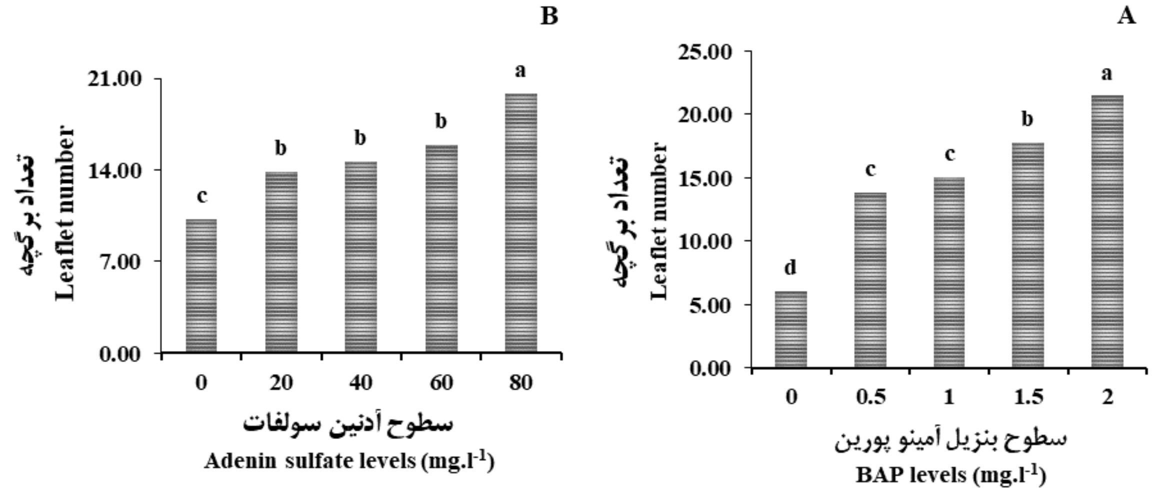
شکل ٤- تعداد برگ در گیاهچه گردو رقم 'چندلر' در سطوح مختلف بنزیل‌آمینوپورین (a) و آدنین‌سولفات (b) در ۸ هفته پس از کشت

Figure 4- The leaf number of walnut cultivar 'Chandler' plantlet with different levels benzyl aminopurine (a) and adenine sulfate (b) in 8 weeks after cultivation(DMRT, $p \leq 0.05$)



شکل ۵- تعداد جوانه در گیاهچه گردو رقم 'چندلر در سطوح مختلف بنزیل‌آمینوپورین (a) و آدنین‌سولفات (b) در ۸ هفته پس از کشت

Figure 5- The bud number of the walnut cultivar 'Chandler'plantlet with different levels of the benzyl aminopurine (a) and adenine sulfate (b) in 8 weeks after cultivation (DMRT, $p \leq 0.05$)



شکل ٦- تعداد برگچه در گیاهچه گردو رقم 'چندلر' در سطوح مختلف بنزیل‌آمینوپورین (a) و آدنین‌سولفات (b) در ۸ هفته پس از کشت

Figure 6- The leaflet number in the walnut cultivar 'Chandler' plantlet in different levels of benzyl aminopurine (a) and adenine sulfate (b) in 8 weeks after cultivation (DMRT, $p \leq 0.05$)



شکل ۷- گیاهچه گردو رقم 'چندلر' در محیط‌کشت DKW حاوی ٦ میلی‌گرم بر لیتر ایندول‌بوتریک‌اسید

Figure 7- Rooted plantlets ofwalnut cultivar 'Chandler' in DKW medium containing 6 mg.l^{-1} indole butyric acid

نتیجه‌گیری

بر اساس نتایج کلی آزمایش مشخص شد که کاربرد هر دو ماده تنظیم‌کننده رشد مورد مطالعه، باعث افزایش معنی‌دار وزن گیاهچه، طول ساقه، تعداد برگ، تعداد جوانه و تعداد برگچه نسبت به تیمار شاهد شدند. درصد قابل توجهی از رشد گیاهچه‌ها هنگام استفاده از مواد تنظیم‌کننده رشد گیاهی حاصل شد و در صورت عدم استفاده از این مواد، هیچ رشدی در گیاهچه دیده نشد. همه صفات مورد ارزیابی با اضافه شدن مقادیر مواد تنظیم‌کننده رشد گیاهی افزایش قابل توجه داشتند ضمن اینکه بالاترین میزان صفات در گیاهچه‌ها در استفاده همزمان از بنزیل‌آمینوپورین و آدنین‌سولفات حاصل گردید.

References

1. Aflaki, M., hatamzadeh, A., & Bahrami Sirmandi, H. (2017). The effect of lignosulfunate on rooting of micropropagated walnut. *Journal of Horticultural Science*, *31*(2), 327-337. (In Persian with English abstract). https://doi.org/10.22067/jhorts4.v0i0.52658

2- Amiri, M.E., & Gharati, S. (2012). Influence of medium composition on multiplication of walnut (*Juglans regia* L.) growth. *Journal of Medicinal Plants Research*, *6*(8), 1482-1485. https://doi.org/10.5897/JMPR11.1491

3- Anonymous. (2020). Agricultural statistics. The first volume: Crops. Ministry of Agricultural Jihad, Planning and Economic Deputy. Information and Communication Technology Center. 125 p. (In Persian)

4- Arab, R., Jafari mofid abadi, A., Majd, A., & Dehghan-Shoreki, Y. (2003). In vitro proliferation of date palm (*Phoneix dactylifera* L. cv. Mazafeti) plantlet derived from embryo culture. *Iranian Journal of Rangelands and Forests Plant Breeding and Genetic Research*, *11*(2), 171-180. (In Persian with English abstract). https://doi.org/10.22092/ijrfpbgr.2003.115495

5- Bhuiyan, F.R. (2013). In vitro meristem culture and regeneration of three potato varieties of Bangladesh. *Research of. Biotechnolnology*, *4*, 29-37. https://doi.org/journal/index.php/rib/article/view/2432

6- Bosela, M.J., & Michler, C.H. (2008). Media effects on black walnut (*Juglans nigra* L.) shoot culture growth in vitro: evaluation of multiple nutrient formulations and cytokinin types. *In Vitro Cellular and Developmental Biology-Plant*, *44*, 316–329. https://doi.org/10.1007/s11627-008-9114-5

7- Driver, J.A., & Kuniyuki, A.H. (1984). In vitro propagation of Paradox walnut (*Juglans hindsii* × *Juglans regia*) rootstock. *Hort Science*, *19*, 507-509. https://doi.org/10.4236/adr.2022.104033

8- Ehteshamnia, A., & Gholami, M. (2014). Inhibition of Persian walnut (*Juglans regia* L.) micro cuttings browning by utilizing different methods. *Journal of Biodiversity and Environmental Sciences* (JBES), *5*(2), 562-571.

9- Hashemidehkordi, E., Mortazavi, S.N., & Azadi, P. (2020). Callus production and organogenesis in pot calla lily (*Zantedeschia* spp. cv. Orania). *FOP*, *5*(1), 13-18. https://flowerjournal.ir/article-1-167-fa.html

10- Kaur, R., Sharma, N., Kumar, K., Sharma, D.R., & Sharma, S.D. (2006). *In vitro* germination of walnut (*Juglans regia* L.) embryos. *Scientia Horticult*, *109*, 385-388. https://doi.org/10.1016/j.scienta.2006.05.012

11- Kepenek, K., & Kolagasi, Z. (2016). Micropropagation of walnut (*Juglans regia* L.). *Acta Physica Polonica*, *130*(1), 150-156. https://doi.org/10.12693/APhysPolA.130.150

12- Mohammadinejad, S., Gholami, M., & Ezni Ashari, M. (2013). The effect of culture media and cytokinin on the primary steps of walnut micro propagation, selected genotype. *Plant Production*, *37*(3), 83-92. (In Persian with English abstract)

13- Nazari, J., Payam noor, V., Alizadeh, M., & Ghasemi Bezdi, K. (2017). Micropropagation of birch (*Betula litwinowii*) from leaf callus. *Forest and Wood Products*, *70*(2), 199-207. https://doi.org/10.22059/jfwp.2017.62477

14- McGranahan, G.H., & Leslie, C.A. (1988). In vitro propagation of mature Persian walnut cultivars. *Hort Science*, *23*, 220.

15- McGranahan, G.H., Tuleke, W., Arulsekar, S., & Hansen, J.J. (1986). Intergeneric hybridization in the Juglandaceae: *Pterocarya* sp. x *Juglans regia*. *Journal of American Society Horticultural Science*, *111*, 627-630. https://doi.org/10.1007/BF00269923

16- Medina, A., Betancourt, M., & Ortiz, R. (2011). Initial development of *in vitro* propagation protocols for Caracas walnut *Juglans venezuelensis*, a critically endangered tree endemic to El Ávila National Park, northern *Venezuela. Conservation Evidence*, *8*, 26-30. www.ConservationEvidence.com

17- Payghamzadeh, K., & Kazemitabar, S.K. (2010). The effects of BAP and IBA and genotypes on *in vitro* germination of immature walnut embryos. *International Journal of Plant Products*, *4*(4), 309-322. https://doi.org/10.22069/ijpp.2012.714

18- Payghamzadeh, K., & Kazemitabar, S.K. (2011). *In vitro* propagation of walnut - A review. *African Journal of Biotechnology*, *10*(3), 290-311.

18- Rodriguez, R. (1982). Callus initiation and root formation from *in vitro* culture of walnut cotyledons. *Horticulture Science*, *17*, 195–196. https://doi.org/10.1016/S0304-4238(02)00003-1

19- Saadat, Y.A., & Hennerty, M.J. (2002). Factors affecting the shoot multiplication of Persian walnut (*Juglans regia* L.). *Scientia Hortticulturae*, *95*, 251–260.

20- Tsonev, T.D., Lazova, G.N., Stoinova, Z.G., & Popova, L.P. (1998). A possible role for Jasmonic acidin adaptation of barley seedling to salinity stress. *Plant Growth Regulation*, *17*, 153-159. https://doi.org/10.1007/PL00007029

21- Vahdati, K., Leslie, C., Zamani, Z., & McGranahan, G.H. (2004). Rooting and acclimatization of *in vitro* grown shoots from mature trees of three Persian walnut cultivar. *Hortscience*, *39*(2), 324–327. https://doi.org/10.21273/HORTSCI.39.2.324

22- Vahdati, K., Najafian Ashrafi, E., Ebrahimzadeh, H., & Mirmasoumi, M. (2008). Improved micropropagation of walnut (*Juglans regia* L.) on media optimized for growth based upon mineral content of walnut seed. *Acta Horticulturae*, 839. https://doi.org/10.17660/ActaHortic.2009.839.13
23- Yari, M., Gholami, M., Esna-Ashari, M., & Kheradmand, H. (2014). Effect of season and explant type on *in vitro* propagation of *Juglans regia* L. genotypes Z60 and Z63. *International Journal of Agriculture and Crop Sciences*, *7*(9), 624-629.
24- Vahdati, K. (2005). *Nursery management and grafting of walnut*. Khaniran Publications, 113 pp.